

BEST AVAILABLE COPY**Membrane and method for the separation of protein-bound substances from a protein-containing liquid by dialysis.****Publication number:** JP7506765T**Publication date:** 1995-07-27**Inventor:****Applicant:****Classification:****- International:** A61M1/14; A61M1/16; B01D61/24; B01D69/02;
B01D69/14; A61M1/34; A61M1/14; A61M1/16;
B01D61/24; B01D69/00; A61M1/34; (IPC1-7):
B01D69/02; A61M1/14; A61M1/16; B01D61/24**- european:** A61M1/16D; A61M1/16R2; B01D61/24; B01D69/02;
B01D69/14B**Application number:** JP19940520382T 19940317**Priority number(s):** DE19934309410 19930319; WO1994IB00073
19940317; US19950570816 19951212**Also published as:**

EP0615780 (A1)

WO9421363 (A1)

DE4309410 (A1)

EP0615780 (B1)

Report a data error here

Abstract not available for JP7506765T

Abstract of corresponding document: **EP0615780**

The present invention relates to a method for the separation of protein-bound substances (PBS) and, if present, water-soluble substances from a protein-containing liquid (A), e.g. blood or plasma, containing said substances, by dialysis using a special semipermeable membrane and a dialysate liquid (B) by means of a protein having an acceptor function for the PBS from liquid (A). The membrane useful for this method has to provide a tunnel-like porous structure on the liquid (A) side and a port- and adsorption-structure on the dialysate liquid (B) side. One or both sides of the membrane, i.e. the protein-containing liquid (A) side and the dialysate liquid (B) side of the membrane, are coated with a protein having an acceptor function the PBS. The PBS-containing dialysate liquid (B) obtained after dialysis may then be purified by passing it through a conventional dialyzer in order to remove water-soluble substances and, then through a charcoal- and a resin-adsorbent in order to remove PBS from the acceptor protein molecules. The purified dialysate liquid (B) obtained containing the free acceptor protein molecules is then used again as dialysate liquid (B).

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-506765

第2部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)7月27日

(51)Int.Cl.*	旗別記号	序内整理番号	F I
B 01 D 69/02		9153-4D	
A 61 M 1/14	5 2 3	9052-4C	
1/16	5 0 0	9052-4C	
B 01 D 61/24		9153-4D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 15 頁)

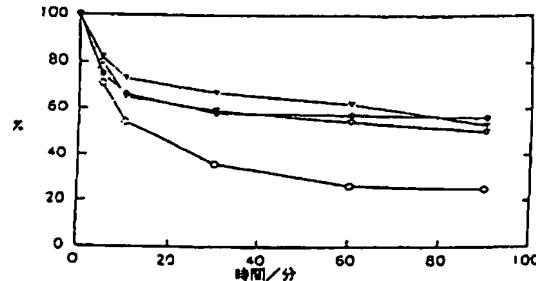
(21)出願番号	特願平6-520382	(71)出願人	スタンゲ, ヤン ドイツ連邦共和国ディー 18055 ロス トック, ダブリュ. ゼーレンビンデルシュ トラーセ 38
(86) (22)出願日	平成6年(1994)3月17日	(71)出願人	ミツナー, ステファン ドイツ連邦共和国ディー 18055 ロス トック, ヴェンデンシュトラーセ 2
(85)翻訳文提出日	平成6年(1994)9月26日	(71)出願人	ラムロウ, ヴォルフガング ドイツ連邦共和国ディー 18209 バッ ト ドベラン, ゲーテシュトラーセ 20
(86)国際出願番号	PCT/IB94/00073	(74)代理人	弁理士 浅村 純 (外3名)
(87)国際公開番号	WO94/21363		
(87)国際公開日	平成6年(1994)9月29日		
(31)優先権主張番号	P 4 3 0 9 4 1 0 . 4		
(32)優先日	1993年3月19日		
(33)優先権主張国	ドイツ (DE)		
(81)指定国	J P		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 蛋白質含有液から蛋白質-結合物質を透析により分離する膜と方法

(57)【要約】

本発明は蛋白質-結合物質 (P B S)、及び存在するならば水溶性物質を含有する蛋白質-含有液 (A)、例えば血液又は血漿からそれら物質を特別の半透膜と、透析液 (B) を使用する透析で、液 (A) からの P B S に対して受容体機能を有する蛋白質により分離する方法に関する。この方法に有用な膜は液 (A) 側にはトンネル-構造を与え、透析液 (B) 側には出入り及び吸着-構造を与えなければならない。膜の1つの面又は両面、即ち膜の蛋白質-含有液 (A) 側と透析液 (B) 側は P B S に対して受容体機能を有する蛋白質で被覆されている。透析後に得られる P B S - 含有透析液 (B) は、次に、水溶性物質を除去するためにその透析液を常用の透析装置に、次いで受容体の蛋白質分子から P B S を除去するために木炭及び樹脂吸着材に通し、通過させることによって精製することができる。得られた、遊離の受容体蛋白質分子を含有する精製された透析液 (B) は次に再び透析液 (B) として再度使用される。



請求の範囲

1. 蛋白質-結合物質をこれら物質を含有している蛋白質-含有液(A)から、透析液(B)に対する透析により分離するための膜にして、該蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質が該膜の少なくとも1つの面に結合されており、該膜は該蛋白質-結合物質が該膜を透過できるそのような孔寸法を有している、前記膜。

2. 構造的に異なる2つの部分(領域)を含み、一方の部分は、蛋白質-結合物質は透過させるが、蛋白質-含有液(A)中の蛋白質-結合物質を結合した蛋白質(頭)と透析液(B)中の受容体蛋白質は結合する実効分離膜機能を有する部分であり、他方の部分は出入り-及び吸着-機能を有する部分である。少なくとも1つの面が蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質で被覆されている、請求の範囲第1項に記載の膜。

3. 蛋白質-含有液(A)の側にトンネル構造を持つ、実効分離膜機能を有する1つの部分と透析液(B)の側に出入り-及び吸着-構造を持つ部分を含み、該トンネルは約1μm未満の長さと、蛋白質-含有液(A)中の蛋白質と透析液(B)中の受容体蛋白質は結合すべく十分に小さい直径を有するものである、請求の範囲第1項又は第2項に記載の膜。

4. トンネルの長さが約5μm未満である、請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の膜。

5. トンネルの長さが約0.1μm未満である、請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の膜。

6. 膜の材料がポリスルホン類、ポリアミド類、ポリカーボネート類、ポリエチレン類、アクリロニトリル重合体類、ビニルアルコール重合体類、アクリレート重合体類、メタクリレート重合体類及び酢酸セルロース重合体類より成る膜から選択されたものである、請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の膜。

7. 膜の材料がポリスルホンである、請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の膜。

8. 膜の材料がポリスルホンである、請求の範囲第1項又は第2項に記載の膜。

16. 蛋白質-含有液(A)が血漿及び血液より成る群から選択されたものであり、そして透析液(B)が蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質としてのヒトの血清アルブミンを含んでいるものである、請求の範囲第9項、第10項又は第11項に記載の方法。

17. 膜が蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質を含んでいる溶液で被覆されている、請求の範囲第9項、第10項又は第11項に記載の方法。

18. 膜が蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質としてのヒトの血清アルブミンを含んでいる溶液で被覆されている、請求の範囲第1～7項に記載の方法。

19. 透析液(B)がヒトの血清アルブミンを100m1当たり約1～約50グラムの濃度で含んでいる、請求の範囲第9項又は第10項に記載の方法。

20. 透析液(B)がヒトの血清アルブミンを100m1当たり約6～約40グラムの濃度で含んでいる、請求の範囲第9項又は第10項に記載の方法。

21. 透析液(B)がヒトの血清アルブミンを100m1当たり約8～約30グラムの濃度で含んでいる、請求の範囲第9項又は第10項に記載の方法。

22. 透析液(B)がヒトの血清アルブミンを100m1当たり約8～約20グラムの濃度で含んでいる、請求の範囲第9項又は第10項に記載の方法。

23. 請求の範囲第1～8項のいずれか1項に記載の膜を含んで成る透析装置を含んでいる、蛋白質-結合物質を含有する血漿又は血液からこれらの蛋白質-結合物質を分離するための使い捨てセット。

24. 透析装置が透析液(B)の側にヒトの血清アルブミンを含有する液体を含んでる、請求の範囲第2～3項に記載の使い捨てセット。

25. 請求の範囲第1～8項のいずれか1項に記載の膜を含んで成る透析装置、第二の常用の血液透析用透析装置、並びに、好ましくは、管材料で相互連結された常用の血液透析用木炭吸着材装置と常用の血液透析用イオン交換樹脂装置、及びヒト血清アルブミン含有透析液(B)の装置を含んでる、蛋白質-結合物質を含有する血漿又は血液からこれら蛋白質-結合物質を分離するための使い捨て。

26. 請求の範囲第1～8項のいずれか1項に記載の膜を含み、かつ透析液

9. 蛋白質-結合物質を含むする蛋白質-含有液(A)を透析液(B)に対して、該蛋白質-結合物質を該透析液(B)側に透過させる膜により、及び該蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する、該透析液(B)中に透析の形態で存在するか、及び/又は該膜の少なくとも1つの面に結合されている蛋白質により透析することから成る、該蛋白質-含有液(A)から蛋白質-結合物質を分離する方法。

10. 蛋白質-結合物質を含むする蛋白質-含有液(A)を、該蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質を含むする透析液(B)に対して、構造的に異なる2つの部分を含む膜により透析することから成る、該蛋白質-含有液(A)から該蛋白質-結合物質を分離する方法にして、該膜の一方の部分は該蛋白質-結合物質と水溶性物質は透過させるが、蛋白質-含有液(A)中の該蛋白質-結合物質を結合した蛋白質(頭)と透析液(B)中の受容体蛋白質は結合する実効分離膜機能を有する部分であり、他方の部分は出入り-及び吸着-機能を有する部分であり、そして該膜は該蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質で被覆されているものである、前記方法。

11. 蛋白質-含有液(A)の側にトンネル構造を持つ、実効分離膜機能を有する1つの部分と透析液(B)の側に出入り-及び吸着-構造を持つ部分を含み、該トンネルは約1μm未満の長さと、蛋白質-含有液(A)中の蛋白質と透析液(B)中の受容体蛋白質は結合すべく十分に小さい直径を有するものである、請求の範囲第9項又は第10項に記載の方法。

12. 膜のトンネルの長さが約5μm未満である、請求の範囲第1項に記載の方法。

13. 膜のトンネルの長さが約0.1μm未満である、請求の範囲第11項に記載の方法。

14. 膜の材料がポリスルホン類、ポリアミド類、ポリカーボネート類、ポリエチレン類、アクリロニトリル重合体類、ビニルアルコール重合体類、アクリレート重合体類、メタクリレート重合体類及び酢酸セルロース重合体類より成る膜から選択されたものである、請求の範囲第1～7項に記載の方法。

15. 膜の材料がポリスルホンである、請求の範囲第14項に記載の方法。

(B)の側にヒト血清アルブミン含有液が充填されて成る透析装置、第二の常用の血液透析用透析装置、管材料で相互連結された常用の血液透析用木炭吸着材装置と、好ましくは常用の血液透析用イオン交換樹脂装置、及びヒト血清アルブミン含有透析液の装置を含んでる、蛋白質-結合物質を含有する血漿又は血液からこれら蛋白質-結合物質を分離するための使い捨てセット。

27. イオンの形で、ナトリウムを約130～約145ミリモル/1000m1、カルシウムを約1.0～約2.5ミリモル/1000m1、カリウムを約2.0～約4.0ミリモル/1000m1、マグネシウムを約0.2～約0.8ミリモル/1000m1、クロリドを約100～約110ミリモル/1000m1、アセテートを約2～約10ミリモル/1000m1及びヒト血清アルブミンを約1～約50グラム/100m1含んで成る、重炭酸塩を緩衝剤とする透析液(B)。

28. イオンの形で、ナトリウムを約130～約145ミリモル/1000m1、カルシウムを約1.0～約2.5ミリモル/1000m1、カリウムを約2.0～約4.0ミリモル/1000m1、マグネシウムを約0.2～約0.8ミリモル/1000m1、クロリドを約100～約110ミリモル/1000m1、バイカーボネートを約3.0～約4.0ミリモル/1000m1、アセテートを約2～約10ミリモル/1000m1及びヒト血清アルブミンを約6～約40グラム/100m1含んで成る、重炭酸塩を緩衝剤とする透析液(B)。

29. イオンの形で、ナトリウムを約130～約145ミリモル/1000m1、カルシウムを約1.0～約2.5ミリモル/1000m1、カリウムを約2.0～約4.0ミリモル/1000m1、マグネシウムを約0.2～約0.8ミリモル/1000m1、クロリドを約100～約110ミリモル/1000m1、バイカーボネートを約3.0～約4.0ミリモル/1000m1、アセテートを約2～約10ミリモル/1000m1及びヒト血清アルブミンを約8～約30グラム/100m1含んで成る、重炭酸塩を緩衝剤とする透析液(B)。

30. イオンの形で、ナトリウムを約130～約145ミリモル/1000m1、カルシウムを約1.0～約2.5ミリモル/1000m1、カリウムを約2.0～約4.0ミリモル/1000m1、マグネシウムを約0.2～約0.8ミリモル/1000m1含んで成る、重炭酸塩を緩衝剤とする透析液(B)。

特表平7-506765 (3)

アセテートを約30～約40ミリモル／1000ml及びヒト血清アルブミンを約8～約20グラム／100ml含んで成る、肝機能を緩衝剤とする透析液（B）。

モル／1000ml、クロリドを約100～約110ミリモル／1000ml、
バикаーボートを約3～約40ミリモル／1000ml、アセテートを約2～約10ミリモル／1000ml及びヒト血清アルブミンを約8～約20グラム／100ml含んで成る、肝機能を緩衝剤とする透析液（B）。

31. イオンの形で、ナトリウムを約130～約145ミリモル／1000ml、カルシウムを約1.0～約2.5ミリモル／1000ml、カリウムを約2.0～約4.0ミリモル／1000ml、マグネシウムを約0.2～約0.8ミリモル／1000ml、クロリドを約100～約110ミリモル／1000ml、アセテートを約30～約40ミリモル／1000ml及びヒト血清アルブミンを約8～約50グラム／100ml含んで成る、肝機能を緩衝剤とする透析液（B）。

32. イオンの形で、ナトリウムを約130～約145ミリモル／1000ml、カルシウムを約1.0～約2.5ミリモル／1000ml、カリウムを約2.0～約4.0ミリモル／1000ml、マグネシウムを約0.2～約0.8ミリモル／1000ml、クロリドを約100～約110ミリモル／1000ml、アセテートを約30～約40ミリモル／1000ml及びヒト血清アルブミンを約8～約40グラム／100ml含んで成る、肝機能を緩衝剤とする透析液（B）。

33. イオンの形で、ナトリウムを約130～約145ミリモル／1000ml、カルシウムを約1.0～約2.5ミリモル／1000ml、カリウムを約2.0～約4.0ミリモル／1000ml、マグネシウムを約0.2～約0.8ミリモル／1000ml、クロリドを約100～約110ミリモル／1000ml、アセテートを約30～約40ミリモル／1000ml及びヒト血清アルブミンを約8～約30グラム／100ml含んで成る、肝機能を緩衝剤とする透析液（B）。

34. イオンの形で、ナトリウムを約130～約145ミリモル／1000ml、カルシウムを約1.0～約2.5ミリモル／1000ml、カリウムを約2.0～約4.0ミリモル／1000ml、マグネシウムを約0.2～約0.8ミリモル／1000ml、クロリドを約100～約110ミリモル／1000ml、アセテートを約30～約40ミリモル／1000ml及びヒト血清アルブミンを約8～約40グラム／100ml含んで成る、肝機能を緩衝剤とする透析液（B）。

明細書

蛋白質含有液から蛋白質-結合物質を透析により分離する顎と方法

発明の説明

1. 技術分野

本発明は顎及び膜輸送法、特に蛋白質-含有液、例えば血漿及び血液から望ましくない又は潜在的に有害な蛋白質-結合物質（PBS）、及びもし存在するならば水溶性物質（低分子量及び中分子量の物質）及び/又は酸性物質を上記顎を使用する透析により分離する効率的な方法に関する。

2. 背景

価値のある蛋白質に強く結合した物質のその蛋白質からの、透析による分離是不可能であるか、又は少なくとも多數の困難を作り。これは蛋白質が血漿又は血清のような複雑な混合物の中に含まれている場合に特に当てはまる。

例えば末期腎臓病（ESRD、尿毒症）において、透析分離技術が血漿からの親水性毒素の分離に広く受け入れられている。今日、腎移植が有効でない場合に、血液透析（HD）を続けることがESRD患者に採られる生命維持の長期治療法となっている。しかし、蛋白質が結合した毒素又は親水性の毒素の除去は医学において現在未解決の問題として残っている。患者における種々の外因性及び内因性中毒の内因には、特にa1b1V8、37m1n-結合毒素（ABT）が関与していることが明らかにされている。

しかし、脂肪、吉草酸、カプロン酸、カブリル酸、チロキシンとトリプトファン、非共役ビリルビン、メルカブタン酸、ジゴキシン様免疫反応性物質、ベンゾジアゼピン様物質、芳香族アミノ酸及びフェノール類等のABT類が、創傷F不全（FHF）における肝性腹膜炎及び大脳水腫の発症原因となっていると思われる。

これらの物質は、少なくとも一部は、FHFに認められる致死性大脳皮質の原因となっていると思われる。更に、FHFには、典型的には、凝血異常、呼吸欠陥、低血容量、肺水腫、電解質平衡異常、酸-塩基平衡、骨格筋不全、低血糖症、

心臓機能不全、敗血症、多器官不全及び死に至る出血が伴われる。その死亡率は、例えば患者の年令と入院時における脳障害の段階に依存して、これまでずっと変わらず、80～100%の高水準にあった。

慢性肝不全においては、一次毒素は異なるだろう（例えば、エタノール）けれども、肝臓の代謝が不十分なことに起因して同じABT類が血中及び脳の中に蓄積する。従って、FHFに普通認められる脳障害のような症状はこれらの患者にも生ずることがあり、しかもFHFの段階に似ている急性の病勢悪化がしばしば認められる。

新生児の高ビリルビン血症がもう1つの臨床的問題のある内因性中毒である。この高ビリルビン血症の形には、血清-脳バリアーが未発達である故に、新生児の脳に対して損傷性の作用があることが知られている。成人におけるビリルビンの毒性作用は検討段階であるが、少なくとも非常に高い濃度においてはその毒性作用を明確に証明できると思われる。

更に、例えばS項式抗うつ剤、ジゴキシン、ジギトキシン、テオフィリン又はベンゾジアゼピンによる偶発的透析液又は自殺的（suicidal）中毒の場合において高アルブミン結合速度を有することが知られている非常に多数の薬剤が存在する。

上記の場合のABT的重要性は一般に知られていることであるが、患者は複雑的なHD治療を受けているにもかかわらず、ESRDにおいてアルブミン結合毒素、例えばフランカルボン類、インドキシルカルフェート、アルミニウムイオン、フェノール類、その他の有機性の有害の容積もある。一方では“中分子量”範囲内の“尿毒症毒素”に対する不満足な研究、また他方では尿毒症の血漿がその限外濾過の滤液より大きな毒性作用を示すと言う事実は、“尿毒症毒素”のあるものは蛋白質を結合させ得るだろうと言う仮説を導いた。

一方では、1976年と言う早い時期にその起源を持つこの理論は、アメリカン・ソサイティー・フォ・アーティフィシャル・インテルナル・オルガニズ（American Society for Artificial Internal Organs）（1983）や、本国、歐州及び日本の多くの専門家によって受け入れられた。これは、アルブミン結合物質を非活性レベルに保つために、肝臓だけでなく腎臓からのそれら物

特表平7-506765 (4)

質の分離に関与していることを示している。このことはある種の薬剤と指示薬質（例えば、フェノールレッド）について既に知られていることであるが、最近になってフラン誘導体についても、そのことが血放透析によっては十分に分離できない質の特別な誘導質として明らかにされた。これは患者の透析においてこれら分子の濃度が、病理生理学的に関係があるだろうレベルに達することを説明するものである。このことの重要性を示すものであるが、血放透析を受ける慢性患者に密接するフランカルボン酸はミコンドリアの胞胞呼吸の強い抑制剤であることが明らかにされた。フラン誘導体は、更に、インピトロで示される透り、DNA合成を妨害することによって細胞増殖の抑制剤として作用する。

ほとんど全ての患者に、高度に特化された、又は増殖性の組織（例えば、造血組織）が不十分であることによって引き起こされる、ESRDにおいてHD治療を続けることのインピギの関係長期合併症（long-term complications）（例えば、透析に関係した貧血、免疫反応の低下、高感染率、腎障害）が認められる。これらのインピトロとインピギの結果における関係を示唆するものであるが、臨床研究は、例えば血放透析を受けている患者の貧血の程度はフランカルボン酸の血漿レベルと強く相関することを明らかにした。

上記疾患の全ての状態に共通していることは、病因にABT類が関与しているだけでなく、貧血症と伴隨し、又は補助治療（例えば、エリトロポイエチン）と反復入院を伴う長期治療のいずれかの治療コストが非常に高いことである。ABTが関係する疾患には、一方では患者数が多いことと治療コストが高いことにより経済的にかなりの幅があり、また他方では死や治療無効に至らしめる総合的な予後の悪さがある（例えば、全世界で維持HDを受けている患者数は400,000人であり、年あたりの治療回数はおおよそ8千万回である）。

ABTが関係する疾病的治療—技術状態

1. 透析及び臓外透析

ABT類は、非透析性のアルブミン分子に対するそれらの親和性の故に、インピトロ及びインピギで透析液に有意の程度には透過して行くことができない。更に、これらABT類の多くは密接に親和性で、水には可溶でない。

普通の血放透析は、血漿から低分子量の物質（<1500ダルトン）は効果的に

分離するが、肝不全の有害な作用の原因であると考えられる蛋白質—結合物質は分離しない。例えば大気孔のポリアクリロニトリル膜を使用する血放透析は、低分子量物質に加えて中分子量（1500-5000ダルトン）の物質は効果的に分離するが、この場合も実験動物で蛋白質—結合物質は分離しない：デ・グロット、GH (De Groot, GH)、シャーム SW (Schalm SW)、シフト I (Schichtl I)：虚血性の肝障害を持つビッグにおける大気孔血放透析：ランダム化研究、肝腎臓学、第31卷（1984年）、第254頁：デ・グロット、GH、シャーム SW、シフト I：ビッグの急性肝不全における大気孔膜による血放透析とクロスー透析との比較（cross-dialysis）、EUR, J. Clin. Invest.、第13卷（1983年）、第66頁を参照されたい。

従って、透析及び臓外透析はこれら物質の分離には満足な方法ではない。

2. 腹膜透析

別の治療法として腹膜透析（PD）を受けている患者は1回のPD期間中に輸血清アルブミンの10%までを失うが、この途中で有害なアルブミン—結合物質（ABT）も勿論失う。臨床研究では、HD患者の典型的な長期合併症、特に前記の貧血はPD患者には既往することができなかった。しかし、PDによるアルブミン—結合毒素のこの向上した除去にはアルブミンの損失が付随する。このアルブミンの損失は死亡率の増加と相関する。更に、PDは腹膜炎を起こす高い危険と関連がある。

3. エリトロポイエチン療法

エリトロポイエチン療法は、部分的には、透析／尿毒症関連貧血を完全に改善するものであるが、高価である。貧血の理由は内因性エリトロポイエチンの欠乏ではない。動脈性高血圧がこの療法において最もしばしば見られる悪影響の1つである。

4. 脾臓移植

この方法でESRDにおいてABT類の除去率が35で、不十分であると言う問題を改善することができる。それにもかかわらず、それには、手術の危険、強い免疫低下、高率の腫瘍の危険を含めて、多数の厳しい合併症がある。経済的

予想はHD治療と違わない。

5. 血液灌流／血漿透析

イオン交換樹脂及び木炭等の異なる又は他の吸着剤上での血液灌流又は血漿灌流も有効であるが、十分に特異性ではない。これらの方程式もホルモン（コレチコステロイド類、チロキシン）に似た本質的物質を除去する。これらのホルモンはそれら自身の輸送蛋白質（コレチコステロイド輸送蛋白質又はチロキシン輸送蛋白質）に結合されている。

これに関してなされた研究の大部分において、血液は木炭又はイオン交換樹脂が入っている吸着剤カラムを通して循流された。この方法で蛋白質—結合毒素は効果的に除去されたが、これには次の欠点が付随した：

- a) 血液細胞、特に血小板の損失。
- b) 細胞因子の損失。
- c) 血液細胞（血小板、白血球）の活性化。
- d) 血栓の活性化。
- e) 結合の絶対的非特異性モードに起因する必須血漿成分の血液化合物（ホルモン、ビタミン、成長因子）の損失。

f) 特に木炭吸着剤が用いられたときの微小粒子の放出。

木炭灌流に見られる悪影響を少なくするために、木炭粒子は色々な血液—適合性物質で被覆されるが、これら木炭吸着剤が示す蛋白質—結合物質に対する結合能は、低い。マイクロカプセル化された木炭上での血液灌流は血漿から低分子量物質（<1500ダルトン）を効果的に除去するが、肝不全の有害な作用の原因であると考えられる蛋白質—結合物質は除去しない。

全ての体内透析技術及び吸着技術の内、アルブミン—被覆樹脂（例えば、アンバーライト（Amberlite）XAD-7）又はアルブミンが共有結合されたアガロースビーズ上の血液灌流がビリルビン、その他の有害な蛋白質—結合有機アノニオンを実験動物の血液から効率的に除去することが明らかにされた【ウィルソン RA (Wilson RA)、ウェブスター KH (Webster KH)、ホフマン AF (Hofmann AF)】：人工肝臓に向かって：肝不全に関係した非結合及び蛋白質—結合血漿化合物のインピトロでの除去、

Gastroenterol.、第62卷（1972年）、第1191頁；シャーシュミット BP (Scherschmidt BP)、プロツト PH (Plotz PH)、パーク PD (Park PD)：アフィニティーアグラムグラフィーによる血液からの物質の除去、II、アルブミン—共役アガロースビーズ上での血液灌流による貧血症状を持つラットの血液からのビリルビンの除去、J. Clin. Invest.、第53卷（1974年）、第786頁】。この方法の選択性又は可能性のある良い作用に関して評価はなされなかった。しかし、これらのアルブミン—被覆吸着剤は低分子量及び中分子量の物質を除去しなかった【ザキム (Zakim) 及びボイラー (Boyer) (編集)、肝臓学、肝疾患の教科書、W. B. ソーンダース社 (W. B. Saunders Company), 1980年、第479-482頁】。

結論として、血液—指標又は血漿—指標は非選択性の方法のままである。

6. 血液交換

この方法では、患者の血漿が血液から虚脱又は遠心分離で分離され、アルブミン溶液又は血漿で置換される。この方法は次の欠点を示す：

- a) ほとんど蛋白質—結合毒素は血漿ばかりではなく、組織にも分布される。血漿交換期間後、毒素の積留された血漿への再分布が起こる。これにはこの治療を受けているFHPの患者が嘔吐から覚めるが、それは治療時間の間だけで、治療が終わったら後はまた深い嘔吐に落ち入ると言う臨床上の現象が伴った。かくして、血漿交換はそれを有効なものにするためには頻繁に行われなければならなかったが、これは以下に述べる典型的な免疫反応に導いた。
- b) 初期的な血漿交換に由来する既知された免疫反応は長い回輸血からアレルギー性反応乃至アナフィラキシー反応として知られていた。特別の表現は“輸血障壁”として記載された。
- c) ウィルス感染の危険が存在する（HIV、肝炎）。
- d) FHPでは、その生体は器官の再生性を高めるために成長ホルモンの分泌が多くなって大量の細胞を増殖させると言う反応を示す。これらの成長ホルモンのレベルは健康なヒトの場合により高く、従ってドナーの血漿には存在しない。
- e) 血漿交換は高価である。

7. 交換輸血

ひどい新生児一高ビリルビン血症では、今日、交換輸血が特に選ばれる治療法である。この療法は回復不能な脳の損傷が予防されるので、患者には有益である。しかし、輸血には上記で血質交換について述べたのと同様の欠点がある。

8. その他の体外法

特にPHFの治療分野に関する、及び蛋白質-結合毒素の除去に対する他の色々な方法が過去何年間もなされて来た：

a) 吸着肝臓細胞に対する木炭-含炭中空纖維/透析

本炭をセルロースの膜に充填することによって透析の血清適合性と木炭吸着の有効性とを併せ持たせ、或いは「中分子量分子」を除去するために吸着剤脂質複合(粉末木炭及びイオン交換樹脂)を再循環させる試みは期待したものに全くならないか、又は期待したものに十分に進行かなかった。特に、ABTの蛋白質が強く結合した部分(例えば、非共役ビリルビン)の除去は不十分であった。この理由は、本発明者の見解では、以下に述べる「トンネル効果」についての性質を全く無くして使用したことにある。

b) 離水性液体膜

離水性の液体を充填して中分子量の脂肪酸及びメルカプタン類のような水不溶性の化合物が通過できるようにした離水性のポリマー-半透膜を使用することによって、蛋白質-結合毒素を除去する努力が更になされた。アルカリ性透析液(pH 13)の溶液がこれら毒素の受容体溶液として選択された。この方法の不利な点は次の通りである：

1. ABT側のあるものはこの液体膜に不溶性であり、従ってそれらは除去プロセスから排除される(非共役ビリルビン)。

2. 離水性毒素(例えば、アンモニア)のその液体中の不溶性はそれらの除去も含み、そして前記中毒のほとんどが離水性毒素及び離水性毒素を含めて複雑な性質のものであるので、更なる透析処理の追加使用を必要とした。追加の透析装置の使用により、体外の血清容積も血清-ポリマーの接触も増加する。最後に述べるが決して容認すべきでないものはコストであるが、それは非常に高い。

3. アルカリ性の透析液溶液の使用は患者には潜在的に有害なもので、少なく

とも膜が損傷する場合それは内因性のPH値に影響を及ぼす。

9. バイオハイブリッド(biohybrid)系

これらの系は自然の酵素をもたらす生化成分(例えば、肝臓切片、肝細胞)を含む血液又は血漿の処理用に設計されたバイオリアクターである。肝臓切片は機械性が限られ、しかも寿命が短いために、細胞に基づく系しか許容できない。この方法の不利益は次の通りである：

a) この処理に必要とされる細胞を十分な量で与える安定かつ安全な供給源がない。

蛋白質-結合毒素の解毒に最も重要な細胞である肝臓の肝細胞は、今まで達成的手法によらないインビトロ培養法で生産することはできなかった。この培養法では、統いて細胞の分化が起こり、従ってこの方法は計り切れない更なる危険と結び付いている。インビトロ培養法で生産することができると思われる肝臓細胞の使用は健康を危険させる危険と、更には予見できない細胞の代謝変化に由来する危険と結び付いている。動物細胞の使用は、一方では患者の血清/血族と、他方では異種間肝細胞との間の免疫反応と結び付いている。

b) 方法の困難性

細胞又は完全なバイオリアクターを凍結保存できる可能性が乏しいために、デバイスの構成は常に使用直前に行わなければならない。このことはこの方法を高度に専門化されたセンターにしか使用できないものにする。

c) 高コスト

この処理の工程は全て高いコストを伴う。

10. 肝移植

肝移植は、今日、慢性的ないわゆる末期肝不全の患者に特に選ばれる方法となっている。それは肝不全について述べられたエイル療法(all therapies)ら最高の長期生存率を示すからである。この方法の制限因子は、適当なドナーの器官の入手性が限られていること(長い待機者リスト)、手術の危険、一般的な合併症(例えば、高い感染の危険、高い腫瘍の危険、糖尿病の危険)と関連した拒否反応をさける、生前にわたる長い免疫抑制治療である。更に、移植の適応症は極めて厳格に定められ、死に至るような病気の非常に多數の患者

は自動的に排除される。かくして、移植は手術に適しないそのような患者に対する十分な解毒装置の必要を避けた。手術に適したこのような多数の患者は、昏迷、低血圧、高い出血の危険を伴うPHFのために、手術を受けるには思すぎる状態にある。これらの患者には、移植の準備のために十分な「肝臓橋掛け治療(liver bridging treatment)」が必要であり、そして多くの場合、患者が移植後にPHFに罹ると、その治療が再び必要になる。最後になるが、決して容認できないことは、移植は手術に由来して、また免疫抑制治療に由来して高コストを引き起こす。

従って、ABT類のような蛋白質-結合物質を蛋白質-含有液、例を挙げると、例えばPHF、慢性肝不全、偶発的又は自殺的薬物過剰投与及びESRDを罹患した患者の血清又は血漿から分離する、効果的で安全な、しかも経費がより少ない方法を提供することが有用であろう。この方法は、例えば有効成分、例えば蛋白質のその液体からの望ましくない除去、又は潜在的に有害な(有毒な)物質のその液体に対する感知により液体、例えば血清の恒常性を妨害しないならば有利であろう。

しかし、本発明の1つの目的は、蛋白質-結合物質をこれら物質を含有する蛋白質-含有液から透析により分離する方法を提供することである。本発明のもう1つの目的は、上記蛋白質-結合物質をこれら物質を含有する蛋白質-含有液から透析により分離するための膜を提供することである。

更なる目的は次の説明、図面及び請求の範囲から明らかになるであろう。

発明の概要

本発明は、蛋白質-結合物質(PBS) - これには強く結合されたものさえ含められる - は蛋白質-含有液(A)から、半透膜の助けを借りて、かつPBSに対して受容体膜を有する蛋白質の助けを借りて、透析液(dialysate liquid)(B)に対して透析することによって除去することができると言う予想外の知見に基づく。

本発明の透析液(B)は、蛋白質-含有液(A)から除去されるべき、一般に蛋白質-含有液(A)中のPBS - 蛋白質結合物質の中に存在する蛋白質のタイプの蛋白質-結合物質(PBS)に対して受容体膜を有する蛋白質を含むしている

のが好ましい。蛋白質-含有液(A)としての血漿又は血清の場合、透析液(B)中の好ましい受容体蛋白質はアルブミン、特にヒトの血清アルブミン又はヒトの組み換えアルブミンである。

本発明の膜は機械的に異なる2つの部分を含んでいるのが好ましい。一方の部分は、本発明の方法の条件下でPBS、及びもしも存在するならば水溶性物質は通過させるが、液(A)中のPBSを結合した蛋白質(膜)と透析液(B)中の受容体蛋白質は排除する実効分離膜機能(actual separating membrane function)を有する部分であり、他方の部分は出入(port) - 及び吸着 - 構造を有する部分である。膜はPBSに対して受容体膜を有する蛋白質で被覆されているのが好ましい。1つの好ましい構造において、本発明の膜は、液(A)の側に面する、膜の長さが約1.0 μm以下で、かつ直後が液(A)中の蛋白質を排除すべく十分に小さいトンネル構造と透析液(B)の側に出入 - 及び吸着 - 構造を含む。膜は少なくとも1つの面において、好ましくは透析液(B)の側において蛋白質-結合物質に対して受容体膜を有する蛋白質の薄いフィルムで被覆されているのが好ましい。

本発明の膜は平らなフィルム、内厚は薄いが直後は大である管又は、好ましくは、中空の細胞と呼ばれた巨視的形態を有するものであることができる。製膜技術、中空纖維膜及び透析については、カーカ・オスマー(Kirk-Othmer)のエンサイクロペディア・オブ・ケミカル・テクノロジー(Encyclopedia of Chemical Technology)、第3版、第7巻(1978年)、第564-579頁、特に第574-577頁、第12巻(1980年)、第492-517頁及び第15巻(1981年)、第92-131頁に記載がある。更に、膜及び脱分離法はウルマンのエンサイクロペディア・オブ・インダストリアル・ケミストリー(Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry)、第5版、第A16巻(1980年)、第187-263頁に記載されている。

膜のマトリックス材料は、液(A)側及び透析液(B)側で蛋白質に対して親和性を有する限り、セラミック、グラファイト、金属、金属酸化物及びポリマーを含めて多数の材料からできていることができる。今日最も広く使用されている方法は、粉末の焼結、フィルムの延伸、フィルムの放射線照射及びエッチング、

特表平7-506765 (6)

並びに軽技術である。本発明の膜に対して好ましい材料はポリスルホン膜、ポリアミド膜、ポリカーボネート膜、ポリエスチル膜、アクリロニトリル複合体膜、ビニルアルコール複合体膜、アクリレート複合体膜、メタクリレート複合体膜及び酢酸セルロース複合体膜より成る群から選択される有機ポリマーである。特に好ましいものは、例えばポリビニルビロリドンで親水性が付与されたポリスルホンの膜である。

膜を正確かつ完全に定義するのはかなり困難なことである：ウルマンの上記引用文献、第180-181頁、No. 2. 1及び2. 2を参照されたい。膜は構造が均質、微孔質又は不均質、對称若しくは非對称であることができる。膜は中性であってもよいし、或いは特定の結合能又は物理能形成能を持つ電荷能を有してもよい。分離プロセスに現在用いられている最も重要な膜は非對称膜である：ウルマンの上記文献、第219頁以降、No. 4. 2を参照されたい。公知の非對称膜は、“フィンガー（finger）”タイプの構造、孔寸法の分布が段階的に変化しているスポンジータイプの構造又は孔寸法の分布が均一であるスポンジータイプの構造を持っている：ウルマンの上記文献、第223-224頁、を参照されたい。

本発明の最も好ましい膜の構造は下部構造が高密度に多孔質である高い選択性又はキン層から構成され、その孔が膜を多少なりとも密度に、スキンから下方に延びているフィンガー又はチャンネルの形で貫通している非對称膜である。非常に薄いスキンが実効膜となり、それは孔を有していることができる。多孔質の下部構造はスキン層の支持体として役立ち、受容体機能を持つ蛋白質がスキンに接近して行き、そしてスキンを膜（A）側から透析膜（B）側の方へ通過して行く蛋白質-結合物質を受容する。

分離手順に先立つて、膜は次のように準備するのが好ましい。即ち、膜を膜（A）側から及び/又は膜（B）側から、受容体機能を有する蛋白質を有する液体、好ましくは受容体蛋白質、好ましくはヒトの血清アルブミンを約1-約5.0g/100mL、更に好ましくは約5-約20g/100mLの濃度で含有する0.9%NaCl溶度で処理する。処理時間は約1.5-約4.0℃、好ましくは約1.8-約3.7℃において約1-約30分、好ましくは約1.0-約2.0分である。

る。

図2は血漿〔膜（A）〕中の初期濃度に対するパーセントで示される、透析膜〔膜（B）：図1に対応するもので、同じ実験により得られる〕における蛋白質-結合物質の増加を示すグラフである。

図3は慢性肝不全が急性悪化した29才の患者の4日間のMARS治療とそれに続く2日間の通常のHDF中の絶対清ビリルビン濃度を示すグラフである。

図4、図5及び図6は本発明による血液透析による血液清型の感覚を例証する図である。

- DA - 透析装置A（アルブミン被覆膜）
- DB - 透析装置B（常用透析装置）
- ADS A-吸着材A
- ADS B-吸着材B
- ポンプ1 - 血液用ローラー（roller）ポンプ
- ポンプ2 - 液-アルブミン透析液用ローラーポンプ
- ポンプ3 - 第二アルブミン透析液用ローラーポンプ
- I-V - 安全装置
- I - 血液用ラインの気泡トラップ
- II - アルブミン透析液用ラインの気泡トラップ
- III - 血液不足デクタ
- IV - 慢性低下チャンバー
- V - 安全クランプ
- 入/出 - 血液の流入及び流出
- X/Y - アルブミン透析液用流動コネクタ（DA）
- U/V - 常用の透析液流動用コネクタ（DB）

血漿〔膜（A）〕は“人”から流れ、ポンプで気泡トラップを経て給送されて透析装置（DA）に入り、そして慢性低下チャンバーを通過し、その後安全クランプを通過。安全装置は本発明の一節ではないが、安全に関する法令上使わなければならない。アルブミン透析膜〔膜（B）〕はローラーポンプ2でコネクタXからコネクタYに向かって、又はコネクタYからコネクタXに向かって給送

る。

本発明の、蛋白質-結合物質、そして勿論存在しているかもしれない普通の水溶性物質の、蛋白質-含有液（A）からの分離法はつぎのように実施される：

精製すべき液（A）を、膜を含む透析装置にその膜の液（A）側に沿って液（A）側で膜面積1平方メートル（sq m）当たり約5.0-約50.0mL/分、好ましくは約1.00-約2.00mL/分の流量で通し、通過させる。透析液（B）を膜の透析液（B）側に沿って膜面積1平方メートル当たり約5.0-約50.0mL/分、好ましくは約1.00-約2.00mL/分の流量で、そして好ましくは液（A）と同じ流量で通す。

液（A）から得られる、蛋白質-結合物質、そして多分水溶性物質を含むする透析液（B）を、次に、常用の透析機器に接続された第二の常用の透析装置に通し、通過させる。水溶性標準透析液に対する透析を行う。この透析によって、水溶性物質は透析液（B）と標準透析液との間で交換される。かくして、尿素又はクレアチニンのような水溶性の要素は透析液（B）から分離することができる、また電解質、グルコース及びpHは透析液（B）中で、従ってまた液（A）中でもその平衡を保たせることができる。停られた、水溶性物質を含まない透析液（B）は、これを次いで木炭-吸着材、例えばガンプロ（GAMBRO AB）から得られるアドソーバ（Adsorba）300°C又はアサヒ社（ASAHI）から得られるN350、及びアニオン交換カラム、例えばアサヒ社から得られるBR350に通し、通過させて透析液（B）中の蛋白質受容体から蛋白質-結合物質を除去するのが好ましい。精製された透析液（B）を次に本発明の膜の透析液（B）側に戻し、再使用する。

他の有利な点及び利益は、当業者には、次に述べられる詳細な説明から明白になるであろう。

図1の説明

図1は本発明の方法に従って、蛋白質-結合物質（非共役ビリルビン、遊離胆酸、フェノール、スルホプロモフタレン）を血漿〔膜（A）〕からインビトロ（試験管内）で分離したその結果を示すグラフである。蛋白質-結合物質（PBS）の減少は血漿〔膜（A）〕中の初期濃度に対するパーセントで示され

されるが、初めは血漿不见デクタ（III）を、また気泡トラップ（II）を通して血漿に対して向流で送られるのが好ましい。その後、膜（B）は常用の透析装置（DB）及び、所望によっては吸着材カラム（A及びB）を経る。

その他の可能性は次の通りである：

- 膜（B）は吸着材を通過するだけであって、透析装置は通過しない；
- 膜（B）は透析装置DBを通過するだけであって、吸着材は通過しない。

常用の透析装置（DB）は、常用の透析器から来るものであってもよいし、或いは他の透析装置又はローラーポンプでバッグから給送されてもよい常用の透析液に接続される。

発明の詳しい説明

A. 蛋白質-含有液から蛋白質-結合物質を分離する方法

本発明は血漿及び血清のような蛋白質-含有液から認ましくないか、潜在的に有害な蛋白質-結合物質及び/又は酸性物質を除去する実際的かつ効果的な方法を提供するものである。基本的な手順は常用の高フラックス透析法と同様であるが、以下に記載される幾つかの修正が本発明により達されている。

1. 透析液（B）

透析液（B）は膜（A）から除去されるべき蛋白質-結合物質（PBS）に対して受容体として役立つ蛋白質を有している。受容体蛋白質は膜（A）中の蛋白質に結合される物質に対して十分な親和性を有しているべきである。好ましい受容体蛋白質はヒトの血清アルブミンである。受容体蛋白質の濃度は約1-約5.0g/100mL、好ましくは約5-約40g/100mL、更に好ましくは約8-約30g/100mL、最も好ましくは約8-約20g/100mLである。

透析液（B）は更にNaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、乳酸ナトリウム及びグルコース！水和物のような盐を、特定の患者の血液中の电解質組成に依存した量で含有している。例えば、低カリウム血症を患っている患者の透析では、より高濃度のカリウムが必要とされる。

血清蛋白質を堆積する透析液（B）中の好ましいイオン濃度は、ナトリウムについて約1.30-約1.45ミリモル/1000mL、カルシウムについて約1.0-約2.5ミリモル/1000mL、カリウムについて約2.0-約4.0ミリモル/1000mLである。

特表平7-506765 (7)

リモル/1000ml、マグネシウムについて約0.2~約0.8ミリモル/1000ml、クロリドについて約100~約110ミリモル/1000ml、バイカーボネットについて約30~約40ミリモル/1000ml、アセテートについて約2~約10ミリモル/1000ml、ヒト血清アルブミンについて約1~約50g/1000ml、好ましくは約8~約40g/1000ml、更に好ましくは約8~約30g/1000ml、最も好ましくは約8~約20g/1000mlである。

重複性を緩衝剤とする透析液(B)中の更に好ましいイオン濃度は、ナトリウムについて約135~約140ミリモル/1000ml、カルシウムについて約1.5~約2.0ミリモル/1000ml、カリウムについて約3.0~約3.5ミリモル/1000ml、マグネシウムについて約0.4~約0.6ミリモル/1000ml、クロリドについて約104~約108ミリモル/1000ml、バイカーボネットについて約34~約38ミリモル/1000ml、アセテートについて約1~約8ミリモル/1000ml、ヒト血清アルブミンについて約1~約50グラム/1000ml、好ましくは約6~約40g/1000ml、更に好ましくは約8~約30g/1000ml、最も好ましくは約8~約20g/1000mlである。

酢酸塩を緩衝剤とする透析液(B)中の好ましいイオン濃度は、ナトリウムについて約130~約145ミリモル/1000ml、カルシウムについて約1.0~約2.5ミリモル/1000ml、カリウムについて約2.0~約4.0ミリモル/1000ml、マグネシウムについて約0.2~約0.8ミリモル/1000ml、クロリドについて約100~約110ミリモル/1000ml、アセテートについて約30~約40ミリモル/1000ml、ヒト血清アルブミンについて約1~約50グラム/1000ml、好ましくは約6~約40g/1000ml、更に好ましくは約8~約30g/1000ml、最も好ましくは約8~約20g/1000mlである。

酢酸塩を緩衝剤とする透析液(B)中の更に好ましいイオン濃度は、ナトリウムについて約135~約140ミリモル/1000ml、カルシウムについて約1.5~約2.0ミリモル/1000ml、カリウムについて約3.0~約3.5ミリモル/1000ml、マグネシウムについて約0.4~約0.6ミリモル/1000ml、クロリドについて約104~約108ミリモル/1000ml、アセテートについて約34~約38ミリモル/1000ml、ヒト血清アルブミンについて約1~約50グラム/1000ml、好ましくは約6~約40g/1000ml、更に好ましくは約8~約30g/1000ml、最も好ましくは約8~約20g/1000mlである。

透析液に対する吸着材として作用する。この吸着は時間中ずっと安定であるこ

とし、その逆であることもできる。膜は少なくとも一方の側において蛋白質-結合物質に対して受容体機能を有する蛋白質の層膜で被覆されているのが好ましい。本発明の膜を含む市販の透析装置は液(B)側に受容体蛋白質の層膜を含有していることができる。

本発明の膜は平らなフィルム、肉厚は薄いが直徑は大である管、又は好ましくは中空細胞の巨視的形態を有していることができる。

膜のマトリックス材料は、液(A)側及び透析液(B)側において蛋白質に対して親和性を有している限り、セラミック、グラファイト、金、金酸化物及びポリマーを含めて、種々の材料からできていることができる。今日最も広く使用されている方法は、粉体の脱脂、フィルムの延伸、フィルムの放射線照射とエッティング、及び転写の各方法である。本発明の膜に好ましい材料はポリスルホン類、ポリアミド類、ポリカーボネット類、ポリエチレン類、アクリロニトリル重合体類、ビニルアルコール重合体類、アクリレート重合体類、メタクリレート重合体類及び酢酸セルロース重合体類より成る群から選択される有機ポリマーである。

本発明において使用される好ましいポリマー膜は、例えばポリビニルビロドンにより親水性が付与された、高度に透過程の非対称ポリスルホン膜、例えばフレセニアス AG社(Fresenius AG)のHP 80である。

このような膜と膜のモジュール、透析カートリッジ、人工腎臓膜系、例えばフレセニアスAG社から、またガンプロB社からポリフラックス(Polyflux)として、バクスター社(Baxter Inc.)からCT 180 Gとして市販されている。

第一部分：液(A)側に面する膜の層又は構造は蛋白質-結合物質及び水溶性物質、即ち低分子物質及び“中分子物質”の、液(A)側から透析用溶液【液(B)側】への選択的移動を可能な限り効率的となるものでなければならない。しかして、望ましくない物質の正確の有効濃度は、液(A)側から透析液(B)側に向かって減少している、望ましくない物質についての濃度勾配に従って液(A)側から透析液(B)側へと起こる。実効膜には2つの条件が満足されね

5ミリモル/1000ml、マグネシウムについて約0.4~約0.8ミリモル/1000ml、クロリドについて約104~約108ミリモル/1000ml、アセテートについて約33~約38ミリモル/1000ml、ヒト血清アルブミンについて約1~約50グラム/1000ml、好ましくは約6~約40g/1000ml、更に好ましくは約8~約30g/1000ml、最も好ましくは約8~約20g/1000mlである。

透析液(B)の1例は、透析液(B)のリットル当たりヒト血清アルブミン約1.0~約2.0重量%、NaCl約0.1g、乳酸ナトリウム約4.0g、KCl約0.15g、CaCl₂×H₂O約0.31g、MgCl₂×6H₂O約0.15g及びグルコース1水和物1.65gを含むものである。

2. 膜

本発明の膜は2つの構造的に異なる部分(領域)を含んでいるのが好ましい。一方の部分はPBSと水溶性物質を本発明の方法の条件下で通過させるが、液(A)中のPBSを結合してしまった蛋白質(膜)と液(B)の受容体蛋白質を排除する実効分離膜機能を有する部分であり、他方の部分は出入り及び吸着-構造を有する部分である。膜はPBSに対して受容体機能を有する蛋白質で被覆されているのが好ましい。1つの好ましい構造において、本発明の膜は液(A)の側に面してトンネル構造を持つ層膜を含んでいる。そのトンネルの長さは約10μm以下、好ましくは約5μm以下、更に好ましくは約0.1μm以下、最も好ましくは約0.1~約0.1μmである。トンネルは液(A)中の蛋白質を排除し、好ましくは約0.01~約0.1μmである。トンネルは液(A)中の蛋白質を排除する実効分離膜機能を有する部分である。液(A)中の蛋白質に対する膜の篩孔数(sieve coefficient)は0.1未満、更に好ましくは0.01未満である。更に、膜は透析液(B)側に出入り及び吸着-構造を含むのが好ましい。この部分は透析液(B)中の受容体蛋白質を出入り及び吸着-層に侵入させて膜の液(A)から来るPBSを受容すべく十分に開口した構造を与えなければならない。更に、この部分の内側表面は以下に述べる被覆法又はPBSの結合に通した他の構造によって吸着される受容体蛋白質を媒介にしての

ばならない：

1. トンネルは十分に短くなければならず、好ましくは約5μm未満、更に好ましくは約1μm未満、最も好ましくは約0.1μm未満でなければならない。

2. トンネルの直径は望ましくない分子は通過させるくらい大きいが、液(A)に含まれる所定の分子の液(B)への、及び受容体蛋白質の液(B)から液(A)への通過は阻止すべく十分に小さくなければならない。膜(A)としての血漿又は血液の場合、その排除限界は約0.6,000ダルトンであるのが好ましい。液(A)中の蛋白質に対する膜の篩孔数は、好ましくは0.1未満、更に好ましくは0.01未満である。

3. 液(A)側に面する膜の層又は構造の化学的、物理的等々の構造は所望されない物質の通過が、例えば親水性及び親水性のミクロドメインによって可能とされるそのような構造である。

第二部分：液(B)側に面する膜の層又は構造は、通常はスponジ構造又はフィンガーベードの模式でより多く開口した膜構造を与えるものでなければならない。この部分は膜のこの部分内に重要な出入り及び吸着-構造を与える：

1. 膜のこの部分の空間の広がった構造に起因して、透析液(B)側から来る受容体蛋白質は上記の液(A)側に面する構造の透析液側の口に接し、液(A)側からトンネル構造を通過して来る、蛋白質-結合物質のような所望とされない物質を受容することができる。

2. この構造中に存在する大きな絶縁表面に起因して、その構造は、この中間膜の吸着において1種のスペーサーとして機能する結合した分子を介して蛋白質-結合物質(PBS)を隔てて多量で吸着するか、又は膜がそれ自身の構造に起因してPBSを吸着する能力を有するならば、PBSが直接膜結合される。この吸着は可逆的であってもよいし、或いは不可逆的であってもよいが、可逆的である方が好ましい。

3. 膜の透析液(B)側に向かって開かれた構造に起因して、外側の膜表面に対して速度又は平行に、或いはそれらとは異なる方式で指向するかもしれない透析物の運動で、受容体蛋白質の分子の出入層への輸送と出入層を出る輸送の調和が可能となる。外側の膜表面に対して速度の運動と輸送は、出入層の中に運動

して行き、そして液(B)の流れに順る液(B)の交互に行われるインフラックス(inline)運動とアウトフラックス(outline)運動で与えられるのが好ましい。このインフラックスとアウトフラックスはローラーボンプを使用することによって得られるパルス様の圧力分布により、又は初めは液(B)に向かって指向され、最後に液(A)に指向されることから生ずる、既に沿って変化する膜側面圧力(transmembrane pressure)の変化(初めのTMPは正、最後のTMPは負)により与えることができる: TMP: 膜側面圧力。

しかし、本発明の透析膜は、膜側面には、トンネル様部分とフィンガーパーク又はスパンジ様出入り/吸着部分に分けられているのが好ましい。それらは、両方共、本発明の方法を可能にするある種の前段条件を満足しなければならない。理想的なトンネル様部分は0に近い長さ(0.01~0.1mm)、滑潤され、保持液(relent liquid)中に保持されるべき所定蛋白質の大きさに近い直徑、例えばアルブミンの直徑を有するものであろう。言い換えると、トンネル様部分は保持液中の、液(A)の直徑のある、所望とされる物質を保持し、液(A)中に含まれる蛋白質-結合物質、その他の所望とされない物質が透析液(B)の側に進むのを可能にすべく十分に小さい直徑を有すべきである。

本発明の透析膜の理想的な出入り/吸着部分は、受容体蛋白質をしてトンネルの透析液中に近い領域に接近せしめ、進むかのを可能にする良く開かれた網目を有する。この部分はPBSを底座、又は結合した受容体蛋白質を経由して吸着する大きな内側表面を有する。この部分の透析膜は、この場合も透析膜の流れへの交換を更に効率的にするのを可能にするほど小さい直徑であるべきである。後者の2点はそれらをそれらの範囲までたらすことができ、それによって他方のものは、吸着が更に望まれるか、又は液の出入り/吸着部分を通過透析が更に望まれるかによるが、ほとんど排除される。

例えば血漿又は血清を透析する通常の透析膜は機能又は構造を基準にして分類することができる。膜上の基準は高ラックスであるか、低ラックスであるか、又は高透通性であるかであり、これに對して構造上の基準は、例えば平らであるか、中空纖維であるか、対称であるか、又は非対称であるかである。本発明に有用なトンネル様膜(TM)の例は次の通りからこれらの用語では十分に記述

されない:

a) TMは高ラックス、高透通性の膜であるが、"高透通性"と称されるあらゆる高ラックス膜が全てTMである訳ではない【例えば、ホスピタル(HOSPITAL)から入手できるAN69】:

b) TM是非対称であることができるが、あらゆる非対称膜が全てTMである訳ではない【例えば、フレセニアスAG社から入手できるP8】:

c) TM是非対称かつ高透通性膜が全てTMである訳ではない【例えば、トーレ社(Toray)から入手できるPMMA】:

d) TMは対称であることができるが、あらゆる対称膜が全てTMである訳ではない【例えば、アクゾ社(AKZO)から入手できるクロファン(Cuprophan)】。

従って、トンネル様膜なる用語は本発明に有用な透析膜の構造上及び膜上の特徴の新しい質を表すものである。

4. 膜の予備処理と条件

本発明の膜には次のようにして予備処理を施すのが好ましい。膜を少なくとも1つの側で、好ましくは液(A)側と液(B)側の両側から受容体蛋白質の溶液により含浸する。含浸工程用の好ましい溶媒は受容体蛋白質、好ましくはヒトの血清アルブミンを約1~約50g/100ml、好ましくは約6~約40g/100ml、更に好ましくは約8~約30g/100ml、最も好ましくは約8~約40g/100ml、最も好ましくは約8~約20g/100mlの濃度で含有する0.8M NaCl溶液である。含浸用溶媒を膜の液(A)側と液(B)側に沿って、受容体蛋白質を膜の両側2つの部分に浸入させ、それら部分に吸着させるのに十分な時間、一般に、約15~約40℃、好ましくは約18~約37℃において約1~約120分間、好ましくは約1~約8分間透析し、この場合pH値は約5~約9、好ましくは約7である。この予備処理は膜の使用直前に行なうことができるが、予備処理された膜は、受容体蛋白質がヒトの血清アルブミンである場合は、冰庫条件下において最高24℃までの温度で最長2年間貯蔵して置くことができる。

含浸用溶媒は透析操作中に"パルス様の圧力分布"を示すローラーボンプで、

例えば1つは透析膜側の隔壁側に、1つは透析装置の血液の隔壁側にある2つのローラーボンプで給送するのが好ましい。両ポンプの圧力分布間に相の流れが存在し、かくして膜の両側での溶液の効率的な流入、流出が確実に行われるようになるのが好ましい。

5. PBSの蛋白質含有液(A)からの分離法

蛋白質-結合物質(PBS)を蛋白質含有液(A)から分離する方法は次のようにして実施するのが好ましい:

精製すべき液(A)を本発明の透析膜の液(A)側に沿って、透析膜の平方メートル当たり約5.0~約30.0ml/分、好ましくは約1.00~約2.00ml/分の流量で通す。透析液(B)を液の透析液(B)側に沿って透析膜の平方メートル当たり約5.0~約1.000ml/分、好ましくは約0.0~約5.0ml/分の流量で通す。液(A)、從って液(B)の流量は同じ大きさのオーダーであるのが好ましい。液(A)対液(B)の流量比は約1:0、1~約1:10、好ましくは約1:1~約1:5である。保持液は精製された蛋白質-含有液(A)であり、それより蛋白質-結合物質、その他の所望とされない物質が除去される。

本発明の方法の1つの好ましい特徴においては、液(A)の第一透析工程は得られた透析液(B)の2つの後処理工程と結合される。

まず、得られた透析液(B)を常用の透析機器に接続されている第二の常用透析装置を通過させる。透析は水性の標準透析液に対して行う。この透析によって、水溶性物質は透析液(B)と標準透析液との間で交換させることができる。水溶性色素、尿素及び/又はクレアチニンは透析液(B)から除くことができ、また電解質、グルコース及びpH値は保持液である透析液(B)中でその平衡を保たせることができる。その後、透析液(B)を木炭-吸着材、例えばガンブロAB止からのアドソーバ(300°C又はアサヒ社からのN350)に通し、通過させて透析液(B)中の受容体蛋白質から蛋白質-結合物質を除去する。精製された受容体蛋白質-含有透析液(B)を次に本発明の液の液(B)側に戻す。

この方法を蛋白質-含有液中のアルブミン-結合薬剤と酵素の分離について実験し、試験すると、液中のこれら化合物に著しい低下がもたらされた。

本発明の方法の他の可能な单纯化された段階は次の修正を含むものである。透析装置から来る透析液(B)をもう1つの透析装置に通し、通過させるが、いかなる吸着材にも通さない。透析装置から来る透析液(B)を1つ又は2つの吸着材に通し、通過させるが、他の透析装置には通さない。透析装置から来る透析液(B)をその透析装置の透析液用隔室の入口に(例えば、ローラーボンプで)直結して戻し、かくして透析液(B)の十分な運動とABTの十分な除去を実現する。更にもう1つの単純な修正段階は、ヒトの血清アルブミンを約1~約5.0g/dl、好ましくは約8~約40g/dl、更に好ましくは約8~約30g/dl、最も好ましくは約8~約20g/dlの濃度で含む透析液(B)が充填された、透析液用の入口と出口が閉鎖されている透析液用隔室を備えた透析装置であろう。透析装置は、例えば透析又は吸着されることによってその全体を運動させることもできる。

本発明の方法の利点は、潜在的に有害な、又は望ましくない蛋白質-結合物質、及び恐らくは望ましくない水溶性物質で汚染された血液又は血漿のような生物蛋白質-含有液を、その液が蛋白質-結合物質、その他の望ましくない物質をより低い濃度で含有し、その液が透析処理前に持っていた潜在的に有害な、又は所望とされない作用を示さなくなるように、本発明の方法により透析的に精製することができる。

本発明の方法のもう1つの利点は、生物学的液体の化学的、物理的恒常性がほとんど変化しないこと、即ちそのために使用される方法と透析膜は良好な生物学的適合性を発揮することである。

本発明の方法は、更に、単純、実用的であり、しかも市販の透析機器により大容量の生物学的液体、例えば外部回路中の血液を繰り返し何回も、色々な条件に対して処理するのに適していると言う利点を有する。

蛋白質-結合物質及び水溶性物質を含有する血漿又は血液からそれら物質を分離する使い捨てセットは、血漿、血液透析用の第二の常用透析装置、血液灌流用の常用木炭吸着材装置とこの吸着材装置に管材で接続された血液灌流用の常用イオン交換樹脂装置、及びヒトの血清アルブミンを含有する透析液の装置を含んで成ることができる。

特表平7-506765 (9)

蛋白質-結合物質及び水溶性物質を含有する血漿又は血清からそれら物質を分離する使い捨てセットは、また前記の膜を有し、透析液 (B) 側にヒト血清アルブミン含有液が充填されている透析袋、血清透析用の第二の常用透析袋、血清透析用の常用本袋吸着袋とこの吸着材袋に蓄積材で接続された血清透析用の常用イオン交換樹脂袋、及びヒトの血清アルブミンを含有する透析液の袋を含んで成ることもできる。

B. PBS 及び水溶性物質の除去の評価

特に、光に対して不安定なビリルビンの分解を避けるために全化合物を実験の直後に測定した。

—プロモスルホフタレイン：ベッチャ (BECH) の方法により分光光法で測定。

—ビリルビン：a) ジエンドラシク (JENDRASSIK) の方法により分光光法で測定；b) コダック・エクタケム (KODAK EKTACHEM) の乾式の化学的方法。これら4方法は使用濃度範囲で良好な相関性を示した。

—フェノール類：a) ベッチャ (BECHER) の方法により分光光法で測定；b) HPLC。この場合もこれら両方法は使用濃度範囲で良好な相関性を示した。

—遊離脂肪酸：ローレル (LAURELL) とチブリング (TIBBLING) の方法による (即ち、脂肪酸はエステルを生成させなかった)。

—ジギヤシン：アボット (ABBOTT) の分析装置/乾式の化学的方法。

—ジギトキシン：アボットの分析装置/乾式の化学的方法。

—クレアチニン、尿素、尿酸、トランスマニナーゼ、血球数：コダック・エクタケムの乾式の化学的方法。

C. インピトロモデル

生物的液体中の減少して行く濃度のみならず、該袖送プロセスを膜に対する吸着と区別する本質的な基準である透析液中の増加して行く濃度をも測定可能にするために、2つの閉鎖ループ式蓄積 (血漿用蓄積と透析液用蓄積) を備えた常圧の透析機器を用いる。高さが約25cmと約10cmで、容積が各々500mlである。一方は血漿を含む生物的液体用の容器としての、他方は透析

液用の容器としての2つのガラス瓶を用いる。これらは併せて、1本は血漿又は透析液の流入用のものであり、もう1本は血漿又は透析液の流出用のものである2つの管のためのコネクタをそれぞれ備えている。“分流原理”を避けるためには、流入と流出との間の距離は10cmより短くすべきではない。各瓶の2つのコネクタを、透析用の常用ローラーポンプを使用できるようにするシリコーンセグメントを各々備えている2本の可撓性プラスチック管 (約100cm、直径約6mm) と接続する。これら2本の管の血漿が入っている瓶から離れた方の他端を透析袋の血漿側のコネクタと次のように接続する：瓶の流出側を透析袋の流入側と接続する。それら2本の管の透析袋が入っている瓶から離れた方の他端を透析袋の透析液側のコネクタと次のようにして接続する：瓶の流出側を透析袋の透析液流入側と接続し、透析袋の透析液流出側を瓶の流入側と接続する。臨床血清透析から知られている通り、透析袋の流れが透析袋を遮って血漿の流れに対して向度で流れるように設計するために、透析袋の血漿流入側を透析袋の流出側の次に配置する。血漿用瓶の流入/流出管のシリコーンセグメントは血漿をシマルタン (simultaneous) 式ローラーポンプで送るために用いられる。また、透析液用瓶の流入/流出管のシリコーンセグメントは、透析液をシマルタン式ローラーポンプで送るために用いられる。こうして四瓶室の流入/流出容量間に平衡が保たれ、結果に影響を及ぼすことから離れた透析液の損失が回避される。

インピトロの実験に用いられる血漿の調製

a) ポリスルホン透析膜を使用しての本発明の方法の評価用

ヒトのヘパリン化された血漿を若い男性ドナーから採取し、蛋白質の結合率が高いモデル物質で変化した：

—カブリル酸 (7.50mg/1000ml)

—フェノール (5.30mg/1000ml)

—非共役ビリルビン (1.1mg/100ml)

—スルホプロモフタレイン (2.30mg/1000ml)

非共役ビリルビン1.10mg、スルホプロモフタレイン2.30mg、カブリル酸7.50mg及びフェノール5.30mgを0.1M・NaOH溶液50mlに溶

解させた。その後、この溶液にヒトのアルブミン [脂肪酸を含まない、シグマ社 (SIGMA)] 2.5gを溶解した。その後、3.0%脂肪酸液の添加によりそのpH値を7.4に調整した。その後、この溶液混合液をヘパリン化血漿950mlと混合した。この血漿溶液500mlを血漿用瓶に詰めた。

透析液の組成：20% (2.0g/1000ml) ヒトアルブミン溶液1000mlを市販のCVVH透析液4000mlと混合した。このアルブミン含有溶液500mlを透析液用瓶に詰めた。

b) 他の透析膜/血液フィルターの評価用

ヒトのヘパリン化血漿を若い男性ドナーから採取し、蛋白質の結合率が高いモデル物質で変化した：

—非共役ビリルビン (1.1mg/1000ml)

—スルホプロモフタレイン (2.30mg/1000ml)

同様に、尿毒症と透析の実効性のマーカーとして知られるモデル物質で変化した：

—クレアチニン (6mg/1000ml)

—尿素 (1.00mg/1000ml)

—尿酸 (1.7mg/1000ml)

非共役ビリルビン1.10mg、スルホプロモフタレイン2.30mg、クレアチニン6mg、尿素1.00mg及び尿酸1.7mgを0.1M・NaOH溶液50mlに溶解した。その後、この溶液にヒトのアルブミン (脂肪酸を含まない、シグマ社) 2.5gを溶解した。その後、室温での3.0%脂肪酸液の添加により、そのpH値を7.4に調整した。その後、この溶液混合液をヘパリン化ヒト血漿950mlと混合した。この血漿溶液500mlを血漿用瓶に詰めた。

膜を詰めた後、それら瓶を閉じて気密にし、そしてポンプセグメント (流入及び流出) をシマルタン式ローラーポンプに、各 (血漿と透析液) サークルを向流式に再循環させるように設置した。流量は1000ml/分に調整した。温度は37°Cで調整した。

次の透析膜/血液フィルターを使用した：

a) 本発明の方法の、原理の評価用

HF 80 : フレセニアスAC社、ドイツ

b) 他の透析膜の評価用

ダイアフィルター (Dialyfilter) 30 :

アミコン社 (AMICON) 、U. S. A.

HF 88 : ガンプロAB社、スウェーデン

ランディア・プロ (LUNDIA PRO) 5 :

ガンプロAB社、スウェーデン

CT 110G : バクスター (BAXTER) 、U. S. A.

スパン (SPAN) : オルガノン・テクニカ (ORGANON TECHNIKA) 、オランダ

KF 201・エバル (EVAL) N 13 : カワミ (KAWASUMI) 、日本

B 1-2, I 1 : トーレ・メディカル社 (TORAY Medical Co.) 、日本

フィルトラル (FILTRAL) 16 : ホスパル社 (HOSPAL) 、フランス

透析膜、各会社から得られた技術情報：

*フレセニアスAC社の高透通性ポリスルホン膜はカットオフ (cut off) (約40,000ダルトン) を決める0.5~1μmのスキン層を持つ非対称膜である。スキン層は高フランク透析膜の厚さ約4.0μmの、及び血漿透析 (hemofiltration) 膜用の厚さ約3.5μmの多孔質の支持層で支持されている。このポリスルホン膜の親水性の表面構造はポリビニルピロリドンで親水化されている。

フレセニアスAC社の低透通性ポリスルホン中空纖維膜はカットオフ (約50,000ダルトン) を決める、厚さ約4.0μmの多孔質の支持層で支持されている0.5~1μmのスキン層を持つ非対称膜である。このポリスルホン膜の親水性表面構造はポリビニルピロリドンで親水化されている。これらの組織は次のフレセニアス透析装置に存在する：F 3、F 4、F 5、F 6、F 7、F 8。

*ホスパル・パン脱 (AN 69) はポリアクリロニトリルに基づく、高透通

特表平7-506765 (10)

を持つ膜厚5.0 μmの対称膜である。この膜はフィルトラル8-20に中空纖維として、またバイオスバル (Bio-spar) に存在する。
*オルガノン・テクニカ社のスパン膜はポリアクリロニトリルに基づく非対称膜である。

*ダイアフィルターは多孔質の支持層で支持されている、カットオフを決めるスキン層を有する非対称の、中空纖維より成る血清フィルター膜である。この血清膜は次のアミコン社のフィルターに存在する：ミニフィルター (Minifilter)、ミニフィルターブラス、ダイアフィルター10、20、30及び50。

*ランディア・プロ5膜は平らなポリカーボネート膜透析膜である。

*ガングロAB社のポリアミド中空纖維膜は3種の改良型で市販される対称膜である：

-高フラックス透析及び血清ダイアフィルターション (hemofiltration) 用の、3層、高親水性度のものとして設計された、内厚5.0 μmのポリアミド。中空纖維の内径は22.0 μmである。これらの中空纖維はポリフラックス (Polylux) 130及びポリフラックス150 (商標名) に存在する。

-血清膜透用の、3層、高親水性度のものとして設計された、内厚6.0 μmのポリアミド。中空纖維の内径は21.5 μmである。これらの中空纖維はPH22、PH7.8に存在し、PH8.8 (商標名) の場合内厚は5.0 μmである。

-水の膜外透用 (熱物質の分離用) の、親水性度がより低い“フィンガーフィル”のものとして設計された内厚6.0 μmのポリアミド。中空纖維の内径は21.5 μmである。これらの中空纖維はU2000及びU7000 (商標名) に存在する。

*KF201・エバールN13は内厚3.2 μmのエチレン-ビニルアルコール共重合体中空纖維膜である。この膜もKF101・エバールN16に存在する。

*トーレ・メティカル社のPMMA中空纖維膜はポリメチルメタクリレートに基づく、内厚3.0 μmの、B1-1、6U及びB1-2、1Uに存在するか、又は内厚2.0 μmの、B2-0、5乃至B2-2、0及びB1-0、6H乃至B1-1、8Hに存在する非対称膜である。

*バクスターCT100Gは三層膜セルロースの中空纖維膜である。それは非対称分布の孔寸法を有し、内厚が1.5 μmである混成 (hybrid) セルロース材料であると記述されている。このタイプの中空纖維もバクスターCT180Gに存在する。

各透析装置を予備透析でのその使用時に透析液側のみならず血清側でもヒトの血清アルブミン浴液 (5 g/100 mL) により流量5.0 mL/分で20分回合透した。

表中の略号：

A1b. -アルブミン

Un. B1L. -非共役ビリルビン

c. B1L. -共役ビリルビン

SBP-スルホプロモタレイン

Ph-フェノール

PFA-抗凝血、この場合カブリル酸

DIG-ジギトキシン

Crea-クレアチニン

Ucr. 磷-尿酸

D. インビトロの結果

a) 原理の評価

表1：インビトロでの血清 (液A) からの

PBSの除去 (HF8.0、フレセニ
アスAG社)、血清濃度 (液A中)

時間	Alb.	Un. B1L.	SBP	Ph	PFA
(分)	(g/dl)	(mg/dl)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
0	3.5	11.70	230	529	749
5	3.4	9.38	180	370	502
10	3.4	8.42	151	291	502
30	3.4	7.72	133	180	434
60	3.4	7.02	124	137	419
90	3.3	5.85	117	127	412

透析液 (B) 中のアルブミンの重要性を証明するために、表1におけると同じ条件下で比較試験を行ったが、ただし透析液 (B) 中のアルブミンは省いた。結果を比較用表1に示す。

比較用表1：インビトロでの血清 (液A) から

のPBSの除去 (HF8.0、フレ
セニアスAG社)、血清濃度 (液
A中)、アルブミンなしの常用透
析液を使用

時間	Alb.	Un. B1L.	SBP	Ph	PFA
(分)	(g/dl)	(mg/dl)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
0	3.5	11.70	230	529	749
5	3.4	11.5	227	420	730
10	3.4	11.42	221	371	723
30	3.4	11.44	218	290	718
60	3.4	11.39	211	270	718
90	3.3	11.40	215	288	724

表2：血清 (液A) からのPBSの除

去 (HF8.0、フレセニアスA
G社)、透析液濃度 (液B中)

時間	Alb.	Un. B1L.	SBP	Ph	PFA
(分)	(g/dl)	(mg/dl)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
0	4.0	0.00	0	0	0
5	3.0	0.9	21	52	149
10	3.1	1.5	48	79	187
30	2.9	1.7	67	100	202
60	2.9	2.1	103	111	217
90	2.8	2.3	119	116	224

比較試験を表2におけると同じ条件下で行ったが、ただし透析液 (B) 中のアルブミンは省いた。結果を比較用表2に示す。

比較用表2：血清 (液A) からのPBSの除去

(HF8.0、フレセニアスAG社)、

透析液濃度 (液B中)、アルブミン
なしの常用透析液を使用

時間	Alb.	Un. B1L.	SBP	Ph	PFA
(分)	(g/dl)	(mg/dl)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
0	0.0	0.00	0	0	0
5	<0.2	0.0	0	28	0
10	<0.2	0.0	0	79	0
30	<0.2	0.0	0	121	0
60	<0.2	0.0	0	173	0
90	<0.2	0.0	0	181	0

特表平7-506765 (11)

b)異なるタイプの透析装置/膜からの結果

表3: 血液(液A)からのPBS及び脱水性

毒素のインピトロ除去(アミコン社製)

ダイアフィルター、血液濃度(液A)

時間	Alb.	SBP	Un. BII.	c. BII.	Crea	尿素	Ur. 酸
(分)	(g/dl)	(mg/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
0	3.5	230	11.7	0.6	6.8	120	16.8
30	3.4	88	4.5	0.47	3.2	37	9.8
60	3.3	58	3.9	0.40	2.9	37	8.1

表4: 血液(液A)からのPBS及び脱水性

毒素のインピトロ除去(アミコン社製)

ダイアフィルター、透析物濃度(液A)

時間	Alb.	SBP	Un. BII.	c. BII.	Crea	尿素	Ur. 酸
(分)	(g/dl)	(mg/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
0	4.0	0	0.00	0.00	0.0	0	0.0
30	3.3	9	0.48	0.14	3.6	47	10.3
60	3.3	44	0.81	0.38	3.5	47	10.3

表5: 血液(液A)からのPBS及び脱水性

毒素のインピトロ除去(ガンプロ社)

からのPHB6)、血液濃度(液A)

時間	Alb.	SBP	Un. BII.	c. BII.	Crea	尿素	Ur. 酸
(分)	(g/dl)	(mg/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
0	3.5	230	11.7	0.6	6.8	120	16.8
30	3.2	47	7.3	0.13	2.8	19	3.0
60	3.1	32	6.3	0.13	2.7	12	3.0

表6: 血液(液A)からのPBS及び脱水性

毒素のインピトロ除去(ガンプロ社)

からのPHB6)、透析物濃度(液A)

時間	Alb.	SBP	Un. BII.	c. BII.	Crea	尿素	Ur. 酸
(分)	(g/dl)	(mg/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
0	4.0	0	0.00	0.00	0.0	0	0.0
30	3.5	33	1.08	0.07	3.5	30	6.9
60	3.3	49	1.68	0.12	3.4	28	6.9

表7: 血液(液A)からのPBS及び脱水性

毒素のインピトロ除去(バクスター社)

からのCT110G)、血液濃度(液A)

時間	Alb.	SBP	Un. BII.	c. BII.	Crea	尿素	Ur. 酸
(分)	(g/dl)	(mg/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
0	3.4	232	11.7	0.6	6.8	120	16.8
30	3.3	114	8.8	0.5	3.0	29	8.2
60	3.2	84	7.6	0.45	3.0	38	8.3

表8: 血液(液A)からのPBS及び脱水性

毒素のインピトロ除去(バクスター社)

からのCT110G)、透析物濃度(液B)

時間	Alb.	SBP	Un. BII.	c. BII.	Crea	尿素	Ur. 酸
(分)	(g/dl)	(mg/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
0	4.0	0	0.00	0.00	0.0	0	0.0
30	3.5	59	0.8	0.02	3.0	38	8.1
60	3.3	84	1.1	0.02	3.0	38	8.1

表9: 血液(液A)からのPBS及び

脱水性毒素のインピトロ除去

(オルガノン・テクニカ社からの

スパン)、血液濃度(液A)

時間	Alb.	SBP	Un. BII.	c. BII.	Crea	尿素	Ur. 酸
(分)	(g/dl)	(mg/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
0	3.5	240	11.7	0.6	6.8	120	16.8
30	3.2	187	8.2	0.58	2.7	38	6
60	3.2	148	8.6	0.58	2.6	38	6

表10: 血液(液A)からのPBS及び

脱水性毒素のインピトロ除去

(オルガノン・テクニカ社からの

スパン)、透析物濃度(液B)

時間	Alb.	SBP	Un. BII.	c. BII.	Crea	尿素	Ur. 酸
(分)	(g/dl)	(mg/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
0	4.0	0	0.00	0.00	0.0	0	0.0
30	3.6	6	0.19	0.17	2.6	38	7.0
60	3.6	18	0.19	0.18	2.6	38	7.0

c)透析液(B)中の色々なアルブミン濃度の影響

フェノール富化血漿: ヒトのヘパリン化血漿を若い男性ドナーから採取し、フェノールで富化した。これはフェノール530mgを0.1M・NaOH溶液50mlに溶解することによって行った。その後、ヒトの血漿(透析液を含まず、シグマ社)2.5gを加えた。次いで、そのpH値を3.0%酢酸塩酸度で7.4に調整した。最後に、この毒素混合液を健康的な若い男性ドナーから採取し、ブーラルして置いた血漿950mlと混合した。この血漿溶液500mlを透析装置の血液側にある血漿用の瓶に満たした。

透析液(B): 20% (20g/1000ml)ヒトアルブミン溶液200mlを市販のCVVH透析液3000mlと混合した。この溶液(即ち、8.0g/1アルブミン)500mlを透析装置の透析液側にある透析物用瓶に満たした。

それらの瓶を満たした後、それを閉じて気密にし、そしてポンプセグメント(流入及び流出)を、各(血漿及び透析液)サークルの再循環を向流で可能にするようにシマルタン式ローラーポンプに設置した。流量は100ml/分に調整した。温度は37°Cに調整した。

表11: 透析液(8g/dl)中のアルブ

ミン濃度が高くなったインピトロ

の血漿(液A)からのフェノール

の除去(HF80、フレセニアス

AG社)、血液と透析物の濃度

時間 フェノールの濃度(mg/l)

時間	液A(血漿)	液B(透析液)
0.0	529	0
2.5	158	148
5.0	132	151
10.0	118	148
20.0	105	147

E. インピボ(生体内)系

市販の透析機器(A2008、フレセニアス社)をインピボ系のハードウェア装置として選択した。器具はいずれも市販のもので、体外治療の血液処理での使用法にはジャーマン・フェデラル・ヘルス・オーソリティー(German Federal Health Authority)【ベルリン(Berlin)】からの安全承認付きであった。

A2008透析機器の血漿ポンプを、両側で前記のようにアルブミン含有された非対称のポリスルホン中空纖維透析装置(1.8平方メートル、HF80、フレセニアス社)を通して100ml/分の透析血液流を供給するために使用した。液(B)の透析物用容器はアルブミンを5g/1000mlの濃度(即ち、静脈内注入又は血漿交換での液体置換に用いられる濃度)で有するリングルラクテート液1000mlを含有する閉鎖ループ系であった。このアルブミン含有液(B)透析液の120ml/分と言う流量はその機器の第二ポンプ(通常、液体の置換に用いられる)で実現された。更に、アルブミン含有液(B)透析液の3

工程再生法を導入し、従ってPBS一分離を高め、そして効果的な血漿離過と水溶性毒素分離の可塑性を付け加えることによってそのインビグリを改良した。

この順序で含有させた段(B)透析物のループ

1. A2008の通常の透析物用隔壁に接続された追加の、専用の大気孔透析装置(1.3平方メートルのポリスルホン中空纖維透析装置、HF80、フレセニアス&G社)。アルブミン含有回路ループの段(B)透析物を上記透析装置の血漿隔壁に通し、通過させたが、他の割では標準透析液透析物(カリウムイオン1ミリモル/リットル)を用いた。この第一工程の目的は肝性昏迷の水溶性蛋白質(アンモニア、バランスの崩れたアミノ酸、共役ビリルビン等)を除去して電解質、グルコース-及びpH-調節を支え、かつ胃毒症材料又は他のタイプの肝不全における胃酸度を文文又は代替することであった。

2. 活性化された木炭の市販カラム(アドソーバ300C、ガンプロAB社)。この第二工程の目的は閉鎖ループ系でのアルブミン溶液の再使用を助長するため、第一段のPBS(例えば、芳香族化合物、野菜)をそのアルブミンから除去することであった。

3. 市販のアニオニン交換樹脂【プラソーバ(Plasorb) BR-850、アサヒ・メディカル社】。この第三工程の目的は非共役ビリルビン及び審査した粗糞のアルブミン溶液からの分離であった。

この再生後、アルブミン溶液は血漿を更に精製するためHF80透析装置の段(B)透析物用隔壁に再接続させた。

F. インビグリの結果

*患者1

患者は6年のアルコール中毒の病歴後に慢性肝不全の急性代償障害を持つに至った30才の白人女性であった。この患者を保存的(conservatively)に10日間治療したが、成功しなかった。この治療に入るところでは、患者は段階IVの肝性脳障害(重い昏睡、痛みの刺激に反応しない患者)の状態にあった。低血圧症、低血鉄症及びアルカロシス(Alkalosis)が認められた。

生化検査: トロンボプラスチック時間【クイック(Quick)】1.8%; 活性化凝固時間は200秒より長かった; 非トロンビンIIIは1.8%であった; 血小板

数は173×10⁹/リットル(減少傾向有り)であった。総ビリルビンは6.15ミクモル/リットル、非共役ビリルビンは5.1ミクモル/リットル、コリンエステラーゼは1.8ミクモル/リットル、アンモニアは9.6ミクモル/リットルであった。アミノトランクルーゼ類の量は5~10倍増加し、血清のpHは7.5であった。患者に3種の治療法を施した(透析3日)。治療時間は1日当たり約7~10時間で、以下に記載する酵素系を用いた。

治療中に不規則な反応は観察されなかった。血圧、酸素飽和度、血中グルコースレベル及び血清のpHは徐々にではあるが、漸進的に改善された。

治療中に、患者は意識消失から回復し、2回目の治療後には脳血管の神経学的症候を残さずに完全に覚醒した(羽ばたき振せんなし)。完全な定位認識有り(fully oriented)、伝達反応と身体的反応に遅れ無し、正常的な反射の回復)。次の数日間に肝機能素の活性が50%まで徐々に減少し、トロンボプラスチック時間は4.0%まで増加した。次の3日以内に血小板数が最高130×10⁹/リットルまで増加し、また血トロンビンIIIは4.3%になった。

表12、患者1: 治療前後の総ビリルビンレベル

回数	時間(分)	総ビリルビン		
		治療前(mg/dl)	治療後(mg/dl)	減少(mg/dl)
1	7	38	25.8	10.7
2	10	34.5	23.2	11.3
3	8	23.5	17.5	6.1

表13、患者1: 治療前後の非共役ビリルビンレベル

回数	時間(分)	非共役ビリルビン		
		治療前(mg/dl)	治療後(mg/dl)	減少(mg/dl)
1	7	3.0	2.5	0.5
2	10	3.3	2.3	1.0
3	8	1.8	1.7	0.1

*患者2、男性、34才、慢性アルコール性肝硬変

患者(体重120kg)は6年間アルコール性であると知られていた人で、感染(発熱、高白血球数、左シフト)の諸症候、食欲絶対及び全身状態の悪化が伴った、進行の遅い黄疸のために病院に入院することが許された。この患者を3週間保存的に治療した。保存性治療の下で全身状態が急速に悪化し、血清ビリルビン濃度が最高37.7mg/100mlまでのレベルに上昇したので、患者をMARS法で治療した。5日間の治療中に、患者の全身状態が更に悪化することとはなかった。4時間の治療時間はこの患者には明らかに短か過ぎた。4日目に2時間の短いMARS治療を2時間の血液ダイアフィルタレーションと組み合わせた。その日の非常に小さい総ビリルビンの差は、恐らくは、効果のない治療と十分な血液循環との組み合わせ効果である。しかし、この短い治療時間でも、尿素、クレアチニン又はアンモニアのような酸性の尿素系の分離のみならず、ビリルビンの分離も可能であった(透析液のサーキットに納められた第二透析装置に起因する)。

表14、患者2: 治療前後の総ビリルビンレベル

回数	時間(分)	総ビリルビン		
		治療前(mg/dl)	治療後(mg/dl)	減少(mg/dl)
1	4	37.7	32.2	5.5
2	5	37.0	28.1	7.9
3	4	32.4	27.5	4.9
4	212	32.8	32.1	0.7
(MARS+HDP)				
5	4	32.4	28.5	3.9

表15、患者2: 治療前後の血清中の尿素及び

クレアチニンのレベル

回数	時間(分)	尿素(mg/dl)			クレアチニン	
		治療前	治療後	治療前	治療後	
1	4	160	138	3.9	3.1	
2	5	194	153	4.1	3.4	
3	4	208	152	4.7	3.6	
4	212	228	136	5.2	3.1	
		MARS+HDP				
5	4	202	148	4.8	3.7	

*患者3、女性、29才、慢性的アルコール性肝不全

この患者はアルコール乱用の長い歴史を有し、肝硬変前段階レベルにあると臨床的に判断される公知の慢性的肝不全を伴っていた。黄疸が増し、全身状態が悪化したとき入院して来た。通常の治療の下でこの患者は肝性脳障害の段階IVに進んだ。即ち、性女は深い昏睡に落ち入り、痛みの刺激に反応を示さなかった。ビリルビンレベルは29.5mg/100mlに上昇した。患者はMARS+治療の第1日目に生命を奪かず激しい腹痛障害、肺水腫、低酸素症を示し、経験を積んだ医師は院死の状態と判断した。この状態において本発明による方法での治療を最終対策(ultima ratio)として開始した。その生命を骨かすひとい状態は2日以内に正常な酸素供給、正常酸素付加(normal oxygenation)及び正常な呼吸を持つ中度の病状に完全に変化した。患者は昏迷から覚め、脳障害の段階I/IIに戻った。即ち、患者は言語は不明瞭であったが、十分に反応した。患者を1日6時間、連続6日間治療した。この期間中にビリルビンレベルは16.2mg/100mlまで速的に減少した。

表16、患者3: MARSの4期間(1~4)との血清
ダイアフィルテーション2期(5~6)中の、
治療前後の総血清ビリルビンレベル

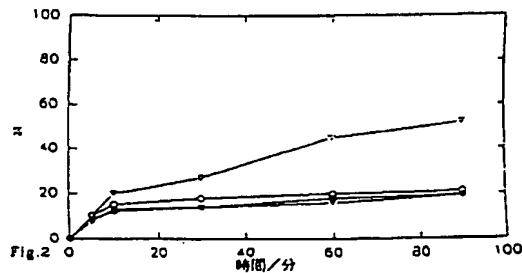
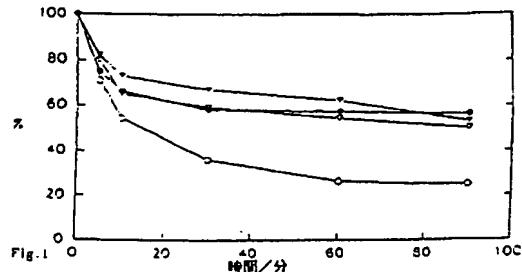
回数	治療時間 (分)	総血清ビリルビン		
		治療前 (mg/dl)	治療後 (mg/dl)	差減少 (mg/dl)
1	5	23.0	24.3	4.7
2	6	26.9	19.9	7.0
3	5	23.4	17.8	5.6
4	5	18.3	13.1	5.2
5	5	15.9	12.9	3.0
6	4.5	16.5	15.6	0.9

*患者4

女性、41才、ジゴキシン中毒

この患者は頻回性不整脈、食欲不振、嘔吐、下痢等のジゴキシン中毒の典型的な臨床症状を示した: ECGは心室不整脈と典型的なST-T変化を示した。(時間)の治療後、臨床症状は完全に正常化し、そのためECG変化を示さなくなつた。

表16は治療の開始時と終点で單一のパス・クリアランス(single pass clearance)を明らかにしている。出発高濃度レベルと初期ループ式吸(B)透析用サーキットでのオンライン吸着/透析によるジゴキシンの十分な再生(3.85~0.5及び2.56~0.54)が認められた。液(B)透析物用サーキットの緩和、及び吸着媒(PBS)は認められなかった。ジゴキシンは多くの組織に分布されているので、血清レベルは普通、他の組織からの連続インターラックスの故に、非常にゆっくり減少する。従って、より長期の治療、理想的には連続治療が望ましいだろう。



中空、三角形-スルホプロモタブレイン
中空、円形-フェノール
充填、三角形-非共役ビリルビン
充填、円形-透析膜防壁

特表平7-506765 (13)

表17、患者4: 4時間のMARS中のジゴキシンの單一パス・クリアランス

ジゴキシン濃度(μモル/l)

時間	場所	血清	透析液
出発時	透析装置の前	7.45	0.50
	透析装置の後	3.66	8.95
終点	透析装置の前	5.84	0.54
	透析装置の後	3.85	2.55

以上の説明は本発明を例証せんとするもので、本発明を規定するものではない。本発明の新規な着想の精神と範囲から逸脱しない限り、多段の変更及び修正を加えることができる。本明細書に記載される特定の組成物と用途に関して規定は図示されていいいか、又は規定と判断すべきではないことを理解すべきである。

本発明はアルブミンに関して不透通性又は本質的に不透通性の膜に関するとしても、本発明はアルブミンに関して部分的に透通性の膜の使用をも包含するものであることを認容されるべきである。

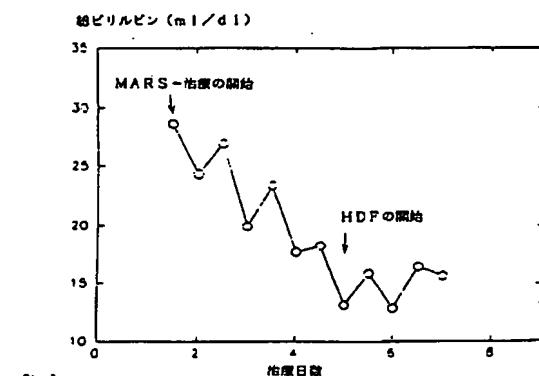
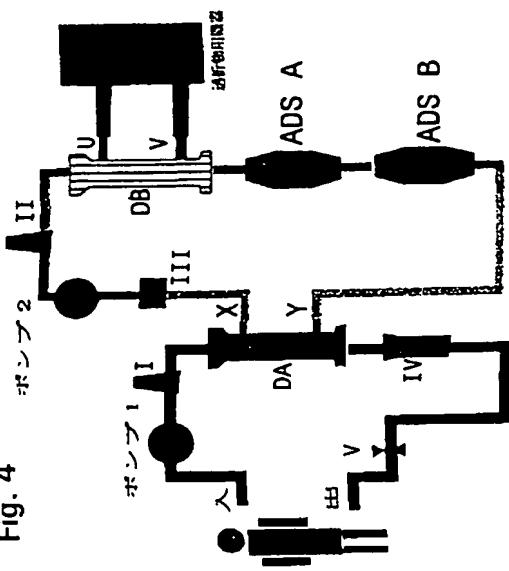
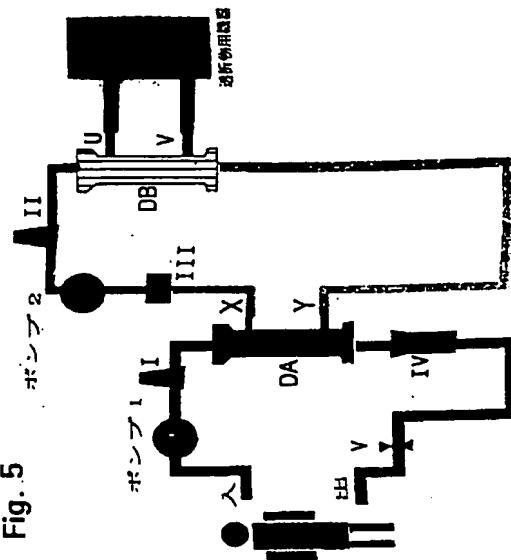


Fig.3

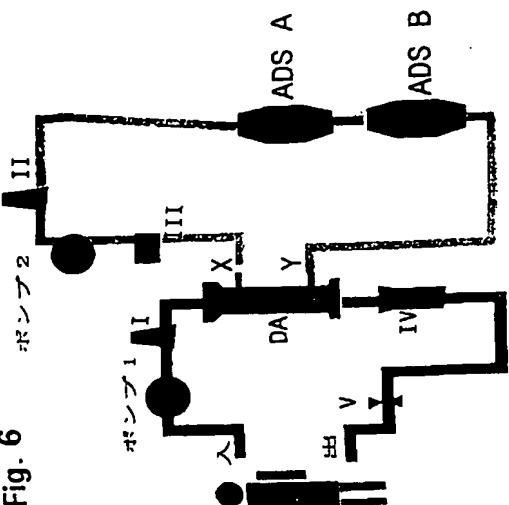
Fig. 4
Fig. 6
Fig. 2



5
Fig.



6
Fig.



国際検査報告書		Report and Application No. PCT/IB 94/00073	
Priority and earliest date of priority or report	Publication date	Patent Family number(s)	Publication date
EP-A-0102564	14-03-84	DE-A- 3230540 WO-A- 8400059	23-02-84 01-03-84
US-A-5075885	07-01-92	HOME	
WO-A-9112072	22-08-91	DE-A- 6167874 AU-B- 637884 AU-A- 7549191 EP-A- 0515684 JP-T- 5504094	01-11-92 10-06-92 03-09-91 09-12-92 01-07-93
EP-A-0166140	15-01-86	DE-A- 4741832 CA-A- 1248325 JP-C- 1581309 JP-B- 2524924 JP-A- 61031165	01-05-86 10-01-89 30-11-80 10-04-90 13-02-86

フロントページの続き

(72)発明者 スタンゲ, ヤン
ドイツ連邦共和国ディー 一 18055 ロス
トック, ダブリュ. ゼーレンビンデルシュ
トラーセ 38

(72)発明者 ミッツナー, ステファン
ドイツ連邦共和国ディー 一 18055 ロス
トック, ヴェンデンシュトラーセ 2
(72)発明者 ラムロウ, ヴォルフガング
ドイツ連邦共和国ディー 一 18209 バツ
ト ドベラン, ゲーテシュトラーセ 20

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.